

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
12. Jg. 1974, S. 159–165

## Zum Einfluß der Temperatur auf Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum: Glutamatdehydrogenase

Von K. Jung, E. Egger, Regina Neumann und Brigitte Lüdtke

Aus der Abteilung Klinische Biochemie und dem Lehrstuhl Pathologische Biochemie (Leiter: Prof. Dr. E. Egger) des Bereichs Medizin (Charité) der Humboldt-Universität Berlin

(Eingegangen am 5. Oktober 1973/1. März 1974)

Am Beispiel der Glutamatdehydrogenase-Aktivitätsbestimmung des Serums wird das komplexe Zusammenwirken der Meßtemperatur mit den anderen Meßbedingungen dargestellt. Hierzu wurden bei 17,8° C, 25° C, 30° C und 37° C die Halbsättigungskonstanten bestimmt und die Substratsättigungs- und pH-Kurven aufgenommen. Es konnten temperaturabhängige Veränderungen der Halbsättigungskonstanten für NADH und 2-Oxoglutarat nachgewiesen werden. Zusatz von ADP beseitigt die durch NADH und Ammoniumacetat hervorgerufenen Substrathemmungen. Der besondere Einfluß des pH-Wertes und der Aktivatorenkombination ADP und Leucin auf die Aktivitätsbestimmung der Glutamatdehydrogenase wird anhand von *Arrhenius*-Auftragungen diskutiert. Unter optimierten Bedingungen der Glutamatdehydrogenase-Aktivitätsbestimmung des Serums konnte eine Denaturierung des Enzyms sowohl in der Vorinkubations- als auch in der Meßzeit bei einer Temperatur von 37° C ausgeschlossen werden.

### *The influence of temperature on the determination of enzyme activities in human serum: Glutamate dehydrogenase*

Using the measurement of glutamate dehydrogenase in human serum as an example, the complex interrelations of reaction temperature and other reaction conditions were shown. Half-saturation constants were estimated, and the activity/substrate concentration plots and the activity/pH plots at 17.8° C, 25° C, 30° C and 37° C were recorded. The pH-optima and half-saturation constants for 2-oxoglutarate and NADH were temperature-dependent. At 37° C, higher 2-oxoglutarate and NADH concentrations and lower pH-values than at 25° C were necessary for optimal conditions. The addition of ADP abolished the inhibition caused by increased concentrations of NADH ammonium acetate. The important influence of pH and the activators ADP and L-leucine on the glutamate dehydrogenase activity in serum is discussed (*Arrhenius*-plot). Under optimized conditions the activity of glutamate dehydrogenase in human serum is not altered at 37° C. It is concluded that for an optimal choice of temperature for enzyme activity determinations in serum, it is very important to take into account the complex relationship between temperature and the other conditions of enzyme reaction.

In der klinischen Chemie werden zur Zeit die meisten Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum bei 25° C, 30° C und 37° C ausgeführt. Als ein Nachteil der Enzymaktivitätsbestimmungen bei höheren Temperaturen wird unter anderem die Denaturierung bzw. Inaktivierung des Enzyms angesehen (1). Der Nachweis der Denaturierung bzw. Inaktivierung eines Enzyms bei höheren Meßtemperaturen ist nach unserer Ansicht erst dann exakt möglich, wenn berücksichtigt wird, daß bei unterschiedlichen Temperaturen die optimalen Werte der anderen Meßbedingungen verschieden sein können. So zeigte Szasz (2), daß die Affinität der Enzyme zu ihren Substraten temperaturabhängig ist. Im allgemeinen sind die komplexen Beziehungen zwischen Meßtemperatur und den anderen Reaktionsbedingungen bisher nur wenig untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wird am Modellbeispiel der Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3), bei der auf Grund ihrer allosterischen Eigenschaften eine besondere Temperaturempfindlichkeit anzunehmen ist (3), die gegenseitige Beeinflussung der Meßbedingungen bei verschiedenen Temperaturen dargestellt.

### Methoden und Material

Die Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgten am Eppendorf-Photometer bei 366 nm in kontinuierlicher Messung mit Schreiber. Die Temperatur im Bestimmungsansatz wurde im temperierten Küvettenhalter über einen Umlaufthermostaten mit Wasserkühlung (Typ U 10, VEB Prüfgerätekwerk Medingen: Wassereinhalte 12 l, Umwälzgeschwindigkeit 6 l/min) konstant gehalten. Die Temperatur im Thermostaten wurde durch ein Kontaktthermometer geregelt und in der Küvette ständig mit einem geeichten Quecksilberthermometer mit geringer Masse bzw. mit einem Thermistor kontrolliert. Das Thermometer war mit einem auf 1/100° C geeichten Thermometer nachgeeicht worden. Die Genauigkeit der Temperaturmessung und die Temperaturkonstanz in der Meßküvette wurden durch eingehende Überprüfungen durch Widerstandsmessungen mit einem geeichten Thermistor und dem Multi-Function Meter 3450 B von Hewlett-Packard überprüft, wobei das zuletzt genannte Gerät jedoch nicht ständig zur Verfügung stand. Auf diese Weise wurde gesichert, daß die Abweichungen von der Solltemperatur bzw. die Temperaturschwankungen im Zeitablauf nicht mehr als  $\pm 0,07^\circ \text{C}$  betrugen. Die angegebenen Aktivitäten entsprechen den aus Doppelbestimmungen gemittelten Umsätzen in der ersten Minute des Linearteils unter Berücksichtigung des unspezifischen Vorlaufs. Das Untersuchungsmaterial wurde zur Erreichung der Temperaturkonstanz etwa 10 bis 15 min vorinkubiert. Aus den Doppelbestimmungen wurde die Standardabweichung  $s$  in der Serie (Aktivitäten von 14,4 bis 94,4 U/l) entsprechend der Formel  $s = \sqrt{\frac{\sum R^2}{2m}}$  ( $R$  = Differenz der Doppel-

bestimmungen,  $m$  = Anzahl der Doppelbestimmungen) zu 1,6 bis 2,7 U/l bei den niederen bzw. höheren Aktivitäten errechnet.

Die Endkonzentrationen im Testansatz von 1,5 ml betrugen, wenn nicht anders erwähnt: 50 mmol/l Triäthanolaminhydrochlorid, pH 7,6, 125 mmol/l Ammoniumacetat, 1 mmol/l Dinatriumäthylendiamintetraacetat, 12 mmol/l 2-Oxoglutarat, 0,3 mmol/l NADH und 1 mmol/l ADP (4). Das Verhältnis von Serum zum Gesamtvolumen betrug 1:7,5. Gestartet wurde mit 2-Oxoglutarat, das bei der jeweiligen Meßtemperatur vorinkubiert wurde.

Der pH-Wert der Puffer-Substrat-Gemische wurde, da Triäthanolamin ein deutlich temperaturabhängiger Puffer ist, für die jeweilige Temperatur potentiometrisch eingestellt. Als Eichpuffer dienten Standardpufferlösungen, die nach den Angaben des National Bureau of Standards bereitet wurden.

Die thermische Stabilität der Glutamatdehydrogenase wurde bei 25°C, 37°C und 56°C geprüft. Hierzu wurde bei den angegebenen Temperaturen unter den im Ergebnisteil näher aufgeführten Bedingungen Serum inkubiert, nach einer vorgegebenen Zeit ein Aliquot entnommen, im Eisbad gekühlt und anschließend im LKB Reaction Rate Analyzer 8600 bei 37°C die Aktivität bestimmt.

Die verwendeten Chemikalien waren analysenrein; die Biochemikalien wurden von der Fa. C. F. Boehringer GmbH, Mannheim bezogen. Als Untersuchungsmaterial verwendeten wir gepooltes Serum von Patienten bzw. mit menschlicher Glutamatdehydrogenase angereicherte Seren. Die Glutamatdehydrogenase wurde nach Lehmann und Pfeleiderer (5) aus Humanleber präpariert (spezifische Aktivität 8,6 U/mg Protein). ADP wurde mit dem Boehringer-Testbesteck bestimmt, NADH bei 366 nm gemessen und der Berechnung ein Extinktionskoeffizient von  $3,3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$  zugrunde gelegt.

Die Signifikanzprüfung der Unterschiede der Halbsättigungskonstanten erfolgte als Signifikanzprüfung der Unterschiede in den Steigungen der jeweiligen Regressionsgeraden, die sich aus der Auftragung von  $v$  gegen  $\frac{v}{[S]}$  ergaben.

## Ergebnisse

Temperaturabhängigkeit der Halbsättigungskonstanten der Glutamatdehydrogenase des Serums

In Abhängigkeit von der Temperatur wurden die Halbsättigungskonstanten der Glutamatdehydrogenase für die Substrate  $\text{NH}_4^+$ , 2-Oxoglutarat und NADH bestimmt und die entsprechenden Substratsättigungskurven aufgenommen (Tab. 1, Abb. 1 bis 3).

Die Halbsättigungskonstanten wurden aus der Regressionsgeraden in der Auftragung  $v$  gegen  $\frac{v}{[S]}$  als negativer Anstieg ermittelt (6). Diese Auftragung wurde gewählt, da die auf diese Weise errechneten Halbsättigungskonstanten ein kleines Vertrauensintervall haben (7) und es mit dieser Methode möglich ist, mit relativ geringem rechentechnischem Aufwand Signifikanzprüfungen durchzuführen.

Die Halbsättigungskonstante für Ammoniumacetat erscheint durch die Temperatur unbeeinflusst. Die Halbsättigungskonstante für NADH im Testansatz ohne ADP nimmt mit steigender Temperatur ab ( $p < 0,05$ ). Mit ADP, d. h. im sogenannten aktivierten Test, erhöht sich dagegen die Halbsättigungskonstante für NADH ( $p < 0,05$ ). Ein Vergleich der Konstanten mit und ohne ADP-Zusatz bei gleichen Temperaturen zeigt für

2-Oxoglutarat bei 25°C und 37°C und für NADH bei 30°C und 37°C mit ADP signifikante Erhöhungen ( $p < 0,05$ ).

Die dargestellten Substratsättigungskurven (Abb. 1,2) verdeutlichen, daß der Zusatz von ADP die durch Ammoniumacetat und NADH bedingten Substrathemmungen aufhebt. Die Hemmung der Glutamatdehydrogenase

Tab. 1. Halbsättigungskonstanten der Glutamatdehydrogenase des Serums unter aktivierten und nichtaktivierten Bedingungen in Abhängigkeit von der Meßtemperatur

Die Daten wurden unter den im methodischen Teil angegebenen Bedingungen ermittelt. 2-Oxoglutarat wurde von 0,2 bis 2 mmol/l, Ammoniumacetat von 2,5 bis 20 mmol/l und NADH von 0,014 bis 0,1 mmol/l unter Berücksichtigung des unspezifischen NADH-Verbrauchs in der Vorinkubation variiert. Errechnung der Halbsättigungskonstanten aus dem negativen Anstieg in der Auftragung von  $v$  gegen  $\frac{v}{[S]}$ . Angabe der Halbsättigungskonstanten in mmol/l.

Temperatur °C	Ammoniumacetat ohne ADP	Ammoniumacetat mit ADP	Oxoglutarat ohne ADP	Oxoglutarat mit ADP	NADH ohne ADP	NADH mit ADP
17,8	23,9	26,9	0,738	0,776	0,085	0,063
25	14,0	24,9	0,688	1,16	0,079	0,077
30	19,0	19,2	0,620	1,04	0,037	0,081
37	19,5	18,9	0,762	1,28	0,048	0,142

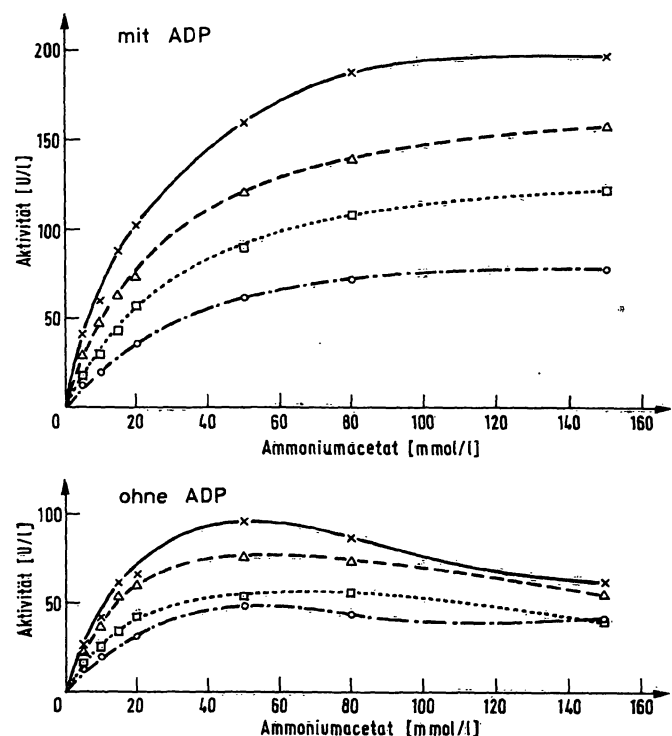


Abb. 1. Einfluß der Meßtemperatur auf die Substratsättigung der Glutamatdehydrogenase für Ammoniumacetat mit und ohne Aktivatorzusatz  
Meßbedingungen: s. Methodik, Aktivierung mit 1 mmol/l ADP ○—○ 17,8°C, □—□ 25°C, △—△ 30°C, x—x 37°C.

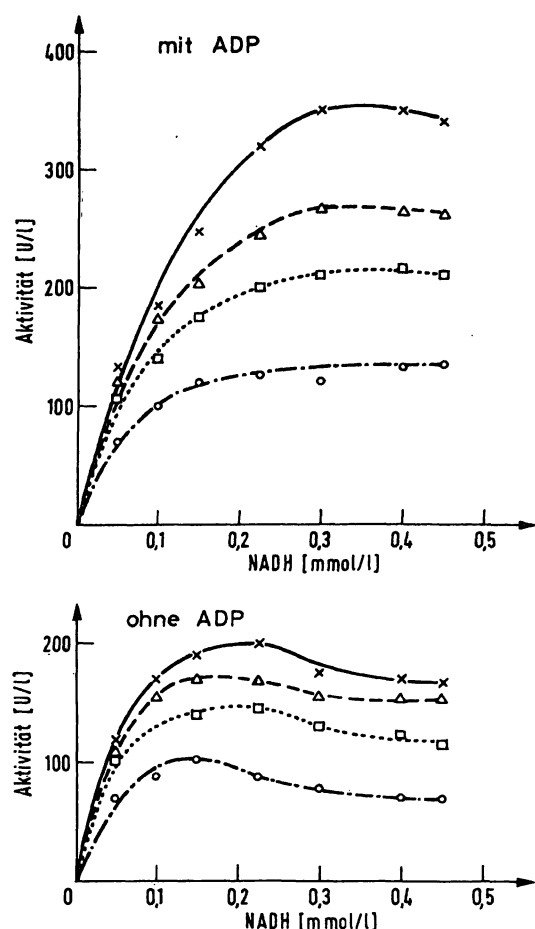


Abb. 2. Einfluß der Meßtemperatur auf die Substratsättigung der Glutamatdehydrogenase für NADH mit und ohne Aktivatorzusatz  
Meßbedingungen und Symbole: s. Abb. 1.

durch Ammoniumacetat wird im nichtaktivierten Test bei höheren Meßtemperaturen verstärkt. Die von Schmidt und Schmidt (8) angegebene Hemmung durch 2-Oxoglutarat konnte in dieser ausgeprägten Form jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 3).

#### Einfluß von pH und Aktivatoren auf die Glutamatdehydrogenase-Aktivität des Serums

Triäthanolamin-Puffer wird als der für Glutamatdehydrogenase-Aktivitätsbestimmungen im Serum günstigste Puffer angesehen (4, 9, 10). Der optimale pH-Wert wird für 25°C mit pH 8,0 (10), für 37°C mit 7,4 (11) bzw. 7,6 (4) angegeben. Schon in einer vorhergehenden Mitteilung (4) wiesen wir daraufhin, daß ein pH von 8,0 bei 37°C sich als ungünstig erweist, wenn nicht mit Aktivatorzusatz gemessen wird. Das pH-Optimum verschiebt sich bei Erhöhung der Meßtemperatur in Richtung zu niedrigeren pH-Werten (Abb. 4). Dies gilt für Meßbedingungen mit ADP-Zusatz, wird aber besonders deutlich bei Aktivitätsbestimmungen ohne ADP-Zusatz. Im zweiten Fall liegt z. B. die bei 37°C, pH 8,0 gemessene Aktivität unter der bei 17,8°C bestimmten. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Denaturierung der Glutamatdehydrogenase in der Vorinkubationszeit

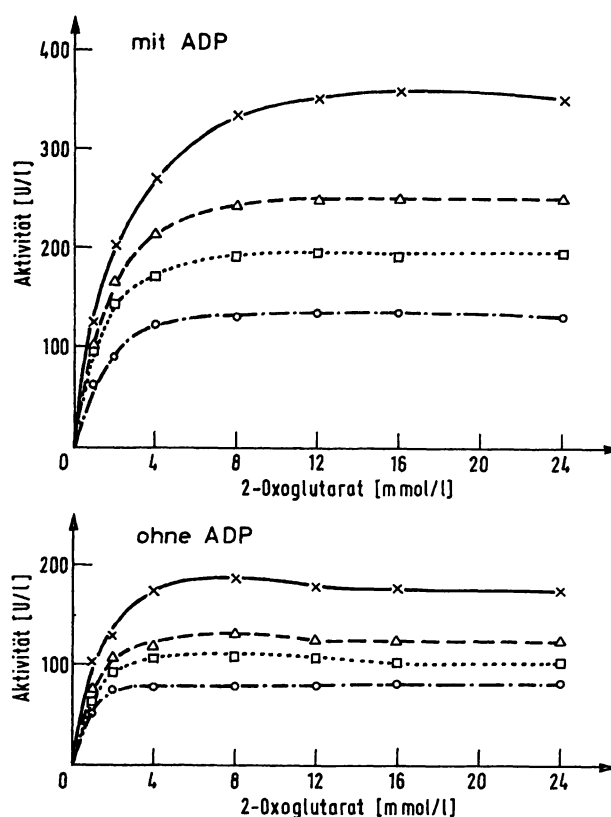


Abb. 3. Einfluß der Meßtemperatur auf die Substratsättigung der Glutamatdehydrogenase für 2-Oxoglutarat mit und ohne Aktivatorzusatz  
Meßbedingungen und Symbole: s. Abb. 1.

(Tab. 2). Ohne Aktivatorzusatz wird in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit eine stetige Aktivitätsabnahme beobachtet, die auch durch Zusatz von ADP und Leucin 1 min vor dem Start mit 2-Oxoglutarat nicht voll reversibel ist. Eine Denaturierung des Enzyms ist daher anzunehmen.

In Abhängigkeit von der Temperatur hat auch die verwendete Pufferkonzentration erheblichen Einfluß auf die gemessene Aktivität. Während bei höheren Triäthanolaminkonzentrationen ohne Zusatz von ADP unabhängig von der Temperatur eine Stimulierung zu beobachten ist, wird der durch Effektoren bedingte Aktivierungseffekt besonders bei höheren Meßtemperaturen beein-

Tab. 2. Denaturierung der Glutamatdehydrogenase bei pH 8,25 in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit  
Meßbedingungen: s. Methodik, Temperatur 37°C. Als Zusatz diente 1 mmol/l ADP + 10 mmol/l L-Leucin. Der Zusatz von ADP und Leucin erfolgte 1 min vor dem Start mit 2-Oxoglutarat. Angabe der ermittelten Aktivitäten in U/l.

Vorinkubation min	mit Zusatz in Vorinkubation	mit Zusatz nach Vorinkubation	ohne Zusatz
5	96,6	56,2	22,5
10	98,5	52,3	20,0
20	101,5	28,1	16,2
30	97,5	23,1	10,0
40	95,0	17,2	11,7
60	96,3	20,6	8,8

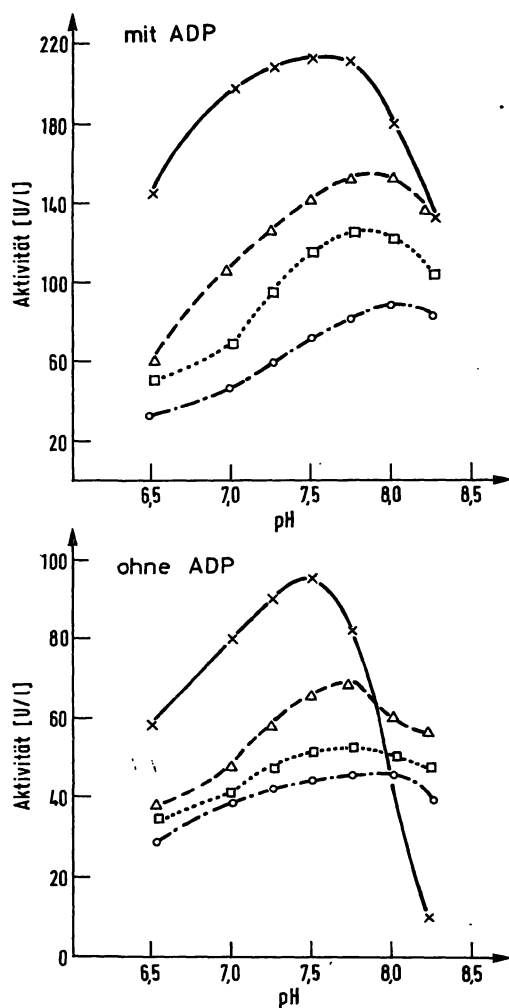


Abb. 4. Einfluß der Meßtemperatur auf die pH-Kurven der Glutamatdehydrogenase-Aktivität mit und ohne Aktivatorzusatz  
Meßbedingungen und Symbole: s. Abb. 1.

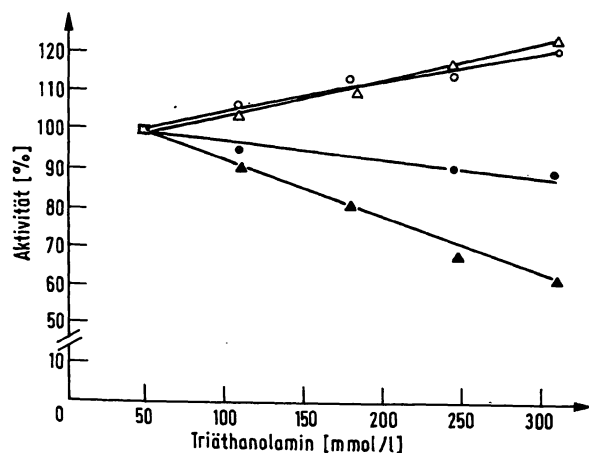


Abb. 5. Einfluß der Pufferkonzentration auf die Glutamatdehydrogenase-Aktivität in Abhängigkeit von der Meßtemperatur mit und ohne Aktivatorzusatz ○—○ 17,8°C, △—△ 37°C. Leere Symbole: ohne Aktivatorzusatz, gefüllte Symbole: 0,4 mmol/l ADP + 10 mmol/l L-Leucin als Aktivatorzusatz.

trächtig (Abb. 5). Aus diesem Grunde ist für eine optimierte Methode der Glutamatdehydrogenase-Aktivitätsbestimmung sowohl bei 25°C als auch bei 37°C (4, 9) eine Pufferkonzentration von 50 mmol/l Triethanolaminhydrochlorid vorgeschlagen worden.

#### Arrhenius-Auftragungen

Aus den vorgenannten Untersuchungen ergibt sich der besondere Einfluß des pH und der Aktivatoren im Meßansatz auf die Glutamatdehydrogenase-Aktivitätsbestimmung in Abhängigkeit von der Temperatur. Dies verdeutlicht die Arrhenius-Auftragung der Glutamatdehydrogenase-Aktivität unter verschiedenen pH-Bedingungen (Abb. 6). Bei höheren Temperaturen wird ein deutlicher Knick im Arrhenius-Diagramm beobachtet, wenn ohne Aktivatorzusatz gearbeitet wird. Dieser Knick ist auch im Meßansatz bei pH 8,0 und pH 8,25 unter ADP- und Leucin-Zusatz nicht zu beseitigen. Eine Gerade wird jedoch bei pH 7,6 mit ADP und Leucin in Kombination erreicht.

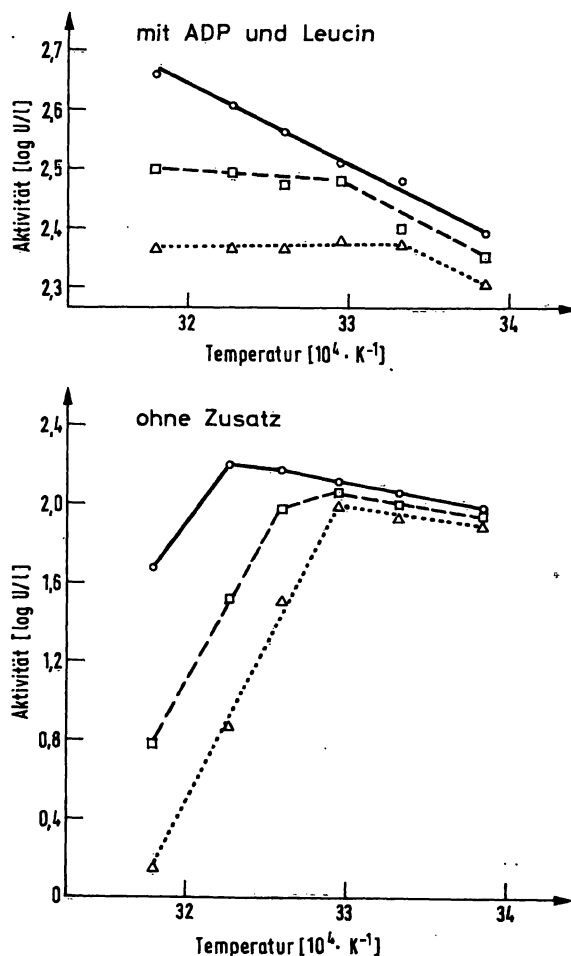


Abb. 6. Einfluß des pH-Wertes auf die Arrhenius-Auftragung für die Glutamatdehydrogenase-Aktivität mit und ohne Aktivatorzusatz  
Die verwendeten Substratkonzentrationen entsprachen den im methodischen Teil angegebenen, die Aktivierung wurde durch 1 mmol/l ADP + L-Leucin erzielt.  
○—○ pH 7,6, □—□ pH 8,0, △—△ pH 8,25.

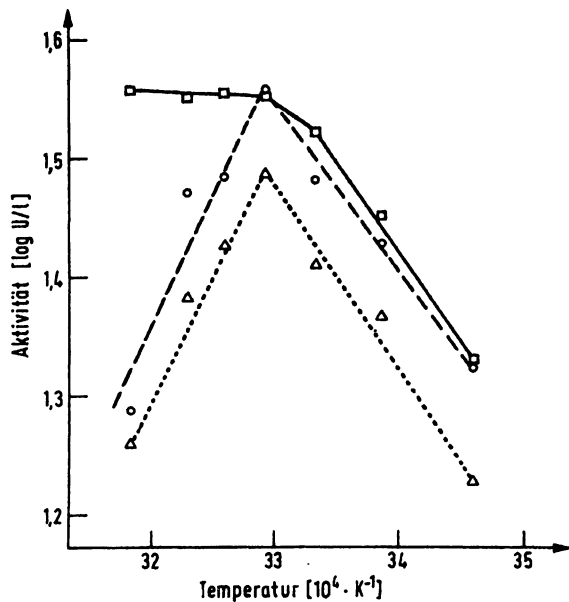


Abb. 7. Einfluß der Aktivatoren ADP und L-Leucin auf die Arrhenius-Auftragung für die Glutamatdehydrogenase-Aktivität unter ungünstigen Reaktionsbedingungen Meßbedingungen: s. Methodik, pH des Meßansatzes pH 8,25.  $\Delta$ ..... $\Delta$  10 mmol/l L-Leucin,  $\circ$ — $\circ$  1 mmol/l ADP,  $\square$ — $\square$  ADP + L-Leucin

Von uns wurde für einen optimierten Test zur Glutamatdehydrogenase-Aktivitätsbestimmung im Serum die Kombination ADP und Leucin vorgeschlagen (4). Der Vorteil dieser Effektorenkombination liegt nicht nur in der erhöhten Aktivierung und dem verringerten ADP-Bedarf, sondern auch in der besonders hohen Schutzwirkung bei ungünstigen Meßbedingungen. Der unterschiedliche Schutzeffekt der einzelnen Aktivatoren bzw. ihrer Kombination wird deutlich bei ungünstigem pH im Testansatz (Abb. 7). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die von anderen Autoren (12) angenommenen unterschiedlichen Angriffspunkte der beiden Aktivatoren auf das Glutamatdehydrogenase-Molekül.

#### Thermische Stabilität der Glutamatdehydrogenase

Im Meßansatz ohne Zusatz von Aktivatoren fiel während einer zweistündigen Vorinkubation bei 37°C die Aktivität auf 80% der Ausgangsaktivität ab. Dieser Abfall wurde unter gleichen Bedingungen auch bei 25°C beobachtet. Durch Zusatz von ADP und Leucin zum Meßansatz bei sonst optimalen Bedingungen (4) wurde dagegen in der genannten Zeit bei 37°C eine Inaktivierung der Glutamatdehydrogenase verhindert. Selbst unter den extremen Bedingungen von 56°C war im Serum innerhalb von 60 min keine Aktivitätsminderung festzustellen (Abb. 8). Mit nur einem Aktivator bzw. ohne Aktivator erfolgt die Inaktivierung jedoch rasch und beinahe vollständig. Die thermische Stabilität der Glutamatdehydrogenase im Meßansatz ist weitgehend vom Proteingehalt der Probe unbeeinflusst.

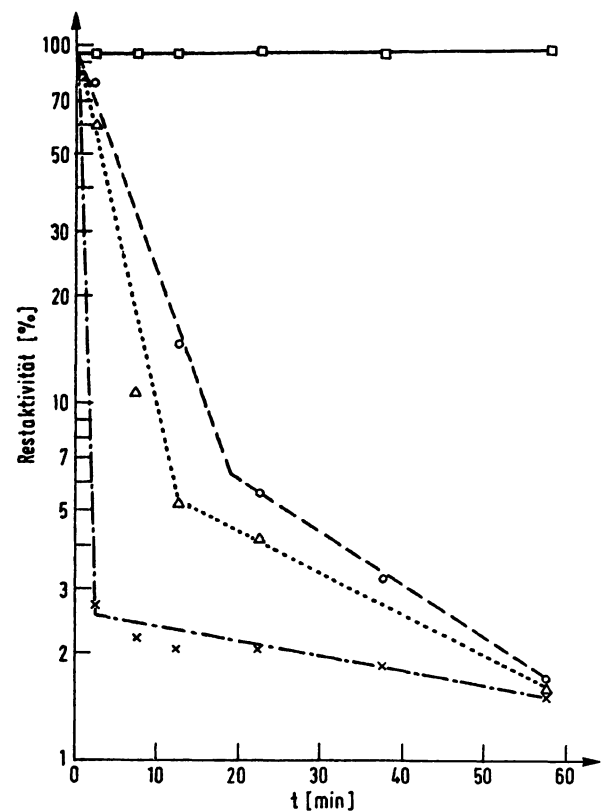


Abb. 8. Einfluß der Aktivatoren ADP und L-Leucin auf die Hitze-stabilität der Glutamatdehydrogenase im Serum bei 56°C 0,5 ml Serum wurden mit 0,1 ml dest. Wasser  $\times$ — $\times$ — $\times$ , mit 0,05 ml 10 mmol/l ADP + 0,05 ml dest. Wasser  $\circ$ — $\circ$ — $\circ$ , mit 0,05 ml 100 mmol/l L-Leucin + 0,05 ml dest. Wasser  $\Delta$ — $\Delta$ — $\Delta$  und mit 0,05 ml 10 mmol/l ADP + 0,05 ml 100 mmol/l L-Leucin  $\square$ — $\square$  versetzt, entsprechende Zeit bei 56°C inkubiert und anschließend unter den im methodischen Teil angegebenen Bedingungen am LKB Reaction Rate Analyzer 8600 bei 37°C bestimmt.

Ein 30fach verdünntes Serum (Protein 73 g/l) zeigte bei einstündiger Vorinkubation bei 37°C im genannten Meßansatz mit ADP- und Leucin-Zusatz keinen Aktivitätsabfall.

#### Diskussion

Ein entscheidendes Problem bei der Standardisierung von Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum ist die zu wählende Meßtemperatur. Als Temperaturen werden 25°C, 30°C und 37°C vorgeschlagen (13). Als ein Nachteil der Enzymaktivitätsbestimmungen bei höheren Meßtemperaturen wird u. a. die Denaturierung bzw. Inaktivierung des Enzymproteins angesehen (1). Kürzlich konnte mit für 25°C optimierten Methoden gezeigt werden, daß bei Meßtemperaturen über 30°C die Transaminasen (EC 2.6.1.1 und EC 2.6.1.2), die Kreatinkinase (EC 2.7.3.2) und die Lactatdehydrogenase-Isoenzyme (EC 1.1.1. 27) im Arrhenius-Diagramm von der Linearität abweichen (2). Unter Berücksichtigung der temperaturabhängigen Substratsättigung wiesen Ellis und Goldberg (14) jedoch für die LDH-1 als Hydroxybutyratdehydrogenase in der Arrhenius-

Auftragung eine Gerade bis 37°C nach. Dies zeigt eindeutig, wie wichtig es ist, die temperaturabhängigen optimalen Reaktionsbedingungen eines Enzyms zu kennen, um seine Denaturierung bei höheren Meßtemperaturen exakt nachweisen zu können. Für die meisten Enzyme im Serum fehlen bisher entsprechende experimentelle Untersuchungen, die den komplexen Charakter des Einflusses der Temperatur im Zusammenhang mit den anderen Meßbedingungen auf Enzymaktivitätsbestimmungen berücksichtigen.

Die von uns unter vergleichbaren Bedingungen ermittelten Halbsättigungskonstanten der Glutamatdehydrogenase für Ammoniumacetat und 2-Oxoglutarat entsprechen etwa den von *Lehmann* und *Pfleiderer* (5) angegebenen  $K_m$ -Werten der Glutamatdehydrogenase aus Humanleber. Die Halbsättigungskonstanten für NADH und 2-Oxoglutarat zeigen jedoch temperaturabhängige Veränderungen. Auffällig ist hierbei, daß im nichtaktivierten Test die Halbsättigungskonstante für NADH mit steigender Temperatur abnimmt, dagegen im Meßansatz mit ADP-Zusatz ansteigt. Dies dürfte auf Veränderungen der allosterischen Eigenschaften der Glutamatdehydrogenase hinweisen, die auf das komplexe Zusammenwirken von Temperatur, NADH und ADP zurückzuführen sind.

Verschiedentlich wurden in der Vergangenheit die Substratkonzentrationen für Enzymaktivitätsbestimmungen auf Grund der  $K_m$ -Werte festgelegt. Erst kürzlich empfahlen *Deggeller* und *Sandifort* (15), die optimale Substratkonzentration entsprechend dem 20fachen  $K_m$ -Wert zu wählen. Bei der Erarbeitung optimierter Methoden von Enzymaktivitätsbestimmungen darf jedoch nicht nur die Halbsättigungskonstante bzw. der  $K_m$ -Wert ausschlaggebend für die Wahl der Substratkonzentration sein. Zur Festlegung der zweckmäßigen Substratkonzentration ist die Aufnahme vollständiger Substratsättigungskurven nach *Michaelis-Menten* unerlässlich, da sonst eventuell auftretende Substrathemmungen nicht berücksichtigt würden. Die Berechtigung dieser Forderung läßt sich am Beispiel der Glutamatdehydrogenase im nichtaktivierten Test für die Substrate Ammoniumacetat und NADH erhärten. Im aktivierten Test, der sich weitgehend durchgesetzt hat, ist keine Substrathemmung mehr festzustellen, dagegen ist zu beachten, daß die optimalen Substratkonzentrationen für NADH und 2-Oxoglutarat für 37°C höher als für 25°C liegen.

Der besondere Einfluß des pH-Wertes auf die Glutamatdehydrogenase-Aktivität in Abhängigkeit von der Meßtemperatur steht im engen Zusammenhang mit dem kooperativen Verhalten dieses Enzyms. Die nachgewiesene Denaturierung des Enzyms unter ungünstigem pH bei höherer Meßtemperatur findet hierin ihre Erklärung. Dieses Beispiel zeigt wiederum, daß die Anwendung der *Arrhenius*-Auftragung zum Nachweis einer Denaturierung oder Inaktivierung eines Enzyms nur dann sinnvoll ist, wenn die für die untersuchten Temperaturen optimalen Reaktionsbedingungen Berücksichtigung finden. Andererseits kann eine Diskontinuität im *Arrhenius*-Diagramm als Ausdruck des Übergangs von einer Aktivierungsenergie zur anderen vielfältiger Natur sein (16). Besonders bei allosterischen Enzymen ist eine solche Diskontinuität nicht unbedingt und in jedem Fall als thermische Denaturierung zu deuten. So wurde bei der Isocitratdehydrogenase (EC 1.4.1.42) von Hefe bei 10°C eine Diskontinuität im *Arrhenius*-Diagramm beschrieben (17). Um eine eventuell stattfindende thermische Denaturierung des Enzyms zu erkennen, ist es erforderlich, den Denaturierungseffekt der Temperatur anhand gestaffelter Vorinkubations- und Meßzeiten zu erfassen. Da bei der Glutamatdehydrogenase eine zweistündige Vorinkubation von Seren im Meßansatz unter Aktivatorzusatz bei 37°C nicht zur Aktivitätseinbuße führt, ist für dieses Enzym eine Denaturierung bei dieser Temperatur unter optimierten Meßbedingungen nicht anzunehmen. Innerhalb einer Meßzeit von 5 min zeigt die Reaktion einen linearen Verlauf (4), sobald gewährleistet wird, daß der NADH-Sättigungsbereich nicht verlassen wird. Damit kann auch eine während der ablaufenden Reaktion stattfindende Denaturierung des Enzyms ausgeschlossen werden. Unter optimierten Bedingungen ist es also möglich, die Glutamatdehydrogenase des Serums auch bei 37°C zu bestimmen, ohne eine Denaturierung des Enzyms befürchten zu müssen.

Wir glauben somit am Beispiel der Glutamatdehydrogenase im Serum gezeigt zu haben, daß bei allen Untersuchungen zum Für und Wider hinsichtlich einer bestimmten Standardtemperatur bzw. der optimalen Temperatur für Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum das komplexe Zusammenwirken verschiedener Faktoren mit der Temperatur unbedingt berücksichtigt werden muß.

## Literatur

1. Bergmeyer, H. U. (1973), diese Z. 11, 39–45.
2. Szasz, G. (1972), 8. Internationaler Kongreß Klinische Chemie, Kopenhagen.
3. Reisler, E. & Eisenberg, H. (1971), *Biochemistry* 10, 2659–2662.
4. Jung, K., Sokolowski, A. & Egger, E. (1972/73), *Enzyme* 14, 44–54.
5. Lehmann, F. G. & Pfeleiderer, G. (1969), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350, 609–616.
6. Augustinsson, K.-B. (1948), *Acta Physiol. Scand.* 15, Suppl. 52, zitiert in: Dixon, M. & Webb, E. C. (1959), *Enzymes*, Longman & Co., London, S. 21.
7. Dowd, J. E. & Riggs, D. S. (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 863–869.

8. Schmidt, E. & Schmidt, F. W. (1962), *Klin. Wochenschr.* **40**, 962–969.
9. Ellis, G. & Goldberg, D. M. (1972), *Clin. Chim. Acta* **39**, 472–474.
10. Empfehlungen der Dtsch. Ges. Klin. Chem. (1972), *diese Z.* **10**, 182–192.
11. Ellis, G. & Goldberg, D. M. (1972), *Clin. Chem.* **18**, 523–527.
12. Markau, K. & Steinhübel, I. (1972), *FEBS Letters* **28**, 115–120.
13. I. F. C. C. Reference Methods for Enzymes, Draft Proposal No. 8.
14. Ellis, G. & Goldberg, D. M. (1971), *Amer. J. Clin. Pathol.* **56**, 627–635.
15. Deggeller, K. & Sandifort, C. R. J. (1973), *Clin. Chim. Acta* **43**, 13–22.
16. Dixon, M. & Webb, E. C. (1964), *Enzymes*, Longman & Co., London, S. 158 ff.
17. Palm, D. & Katzendobler, H. (1972), *Biochemistry* **11**, 1283–1289.

Dr. K. Jung, Prof. Dr. E. Egger,  
Regina Neumann und Brigitte Lüttke,  
Abteilung Klinische Biochemie  
des Bereichs Medizin (Charité)  
und Lehrstuhl für Pathologische Biochemie  
der Humboldt-Universität Berlin,  
104 Berlin, Schumannstraße